

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
12. Jg. 1974, S. 361–366

## Über den Einfluß von Fett auf die Proteinbestimmung mit Biuret- und *Folin-Ciocalteus* Phenol-Reagenz in Leberhomogenaten

Von A. Metz und K. Reinert

Medizinisch-Biologische Forschungsabteilung Sandoz AG, Basel (Schweiz)

(Eingegangen am 8. Februar/29. Mai 1974)

Die vorliegende Studie behandelt die Problematik der photometrischen Proteinbestimmung in Leberhomogenaten in Anwesenheit steigender Fettmengen und zeigt die dabei auftretenden Fehlermöglichkeiten auf. Es wird vorgeschlagen, diese Fetttrübungseinflüsse entweder durch Detergenzzusatz (Desoxycholat) oder durch Verwendung von Spektralphotometern mit speziellen Meßanordnungen für Trübungsmessungen zu unterdrücken.

### *The influence of fat on the determination of protein by the biuret and the Folin-Ciocalteu methods in liver homogenates*

The present study deals with the spectrophotometric determination of protein in liver homogenates and the errors of determination liable to occur due to clouding of the test sample by the presence of lipids. Two ways of suppressing this source of error are described: the addition of a detergent (desoxycholate) to the test sample to clear the clouding, and the use of appropriate optical equipment to correct the scattering effect of the clouding on the light beam being measured.

Für die quantitative Erfassung von Gewebsproteinen stehen heute im wesentlichen drei Methoden zur Verfügung: die Bestimmung nach *Kjeldahl*, die Biuretmethode (1) und deren Modifikation nach *Lowry* (2) unter Verwendung von *Folin-Ciocalteus* Phenolreagenz. Von diesen Verfahren werden vor allem die zwei letztgenannten Methoden für die Eiweißbestimmung in Leberhomogenaten angewendet (3–8). Vergleicht man jedoch die verschiedenen Literaturangaben über den Proteingehalt normaler Lebern (z. B. bei der Ratte), so findet man Schwankungen im Bereich von 100–300 mg/g Leber. Da unseres Erachtens die auftretenden Differenzen nicht allein auf unterschiedliche Aufarbeitungsmethoden zurückgeführt werden können, haben wir uns ausführlich mit diesen beiden photometrischen Bestimmungen befaßt.

In der vorliegenden Studie wird an Rattenleberhomogenaten der Einfluß von Fett auf die Proteinbestimmung dargestellt. Gleichzeitig wird nach Möglichkeiten zur Ausschaltung dieser Störung gesucht.

## Material und Methoden

### Methoden

Folgende Methoden kamen bei den Untersuchungen zur Anwendung: Gesamteiweißbestimmung nach *Lowry* (2) mit *Ciocalteu*-Phenolreagenz und nach *Weichselbaum* (1) mit Biuretreagenz. Lebertrockengewicht und Sedimentsbestimmungen von zentrifugierten Homogenaten wurden nach Lyophilisation gravimetrisch ermittelt.

### Apparaturen

Blutzentrifuge (MSE), Ultraschallgerät (MSE), Photometer (Eppendorf), Vibrator (Vortex, Fa. Bender und Hobein, Zürich), Polytron-Homogenisator (Kinematica, Luzern), Lyophilisator GT-2 (Leybold Heraeus), Pye Unicam SP-1800 Ultraviolett-Spektrophotometer mit sekundärer Meßposition für Trübungsmessungen.

### Reagenzien

Kupfer[II]-sulfat (Pentahydrat) p.a. Fluka (Nr. 61240) Buchs; *Folin-Ciocalteu*-Phenolreagenz (Art. Nr. 9001), Natriumdesoxycholat p.a. (Art. Nr. 6504), Chloroform p.a. (Art. Nr. 2445) von Merck, Darmstadt; Brij-35, Levor IV und Aerosol 22 von Technicon Genf; Sterox SE Merz und Dade, Bern, Eiweißstandard: Monitrol I, Merz u. Dade, Bern; Versatol, General Diagnostics (Cosmopharm Zürich); Kaliumnatriumtartrat (Tetrahydrat) Art. 8087 Merck.

### Herstellung der Lösungen für Eiweißbestimmungen

#### *Eiweißbestimmung nach Lowry*

1. 2 g Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) in 1000 ml 0,1 mol/l Natronlauge
2. 0,5 g Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) in 1000 ml Natriumkaliumtartratatlösung\* ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : 1 g/100 ml dest. Wasser)
3. alkalische Kupferlösung  
50 ml Reagenz 1 und 1 ml Reagenz 2 mischen und 24 Stunden stehen lassen.
4. *Folin-Ciocalteus* Phenolreagenz (Merck) mit gleichem Volumen dest. Wasser verdünnen.
5. alkalische Tartratatlösung (für Leerwertsbestimmung)  
50 ml Natriumcarbonatlösung (1) und 1 ml Natriumkaliumtartratatlösung\* ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : 1 g/1000 ml dest. Wasser) mischen.

#### *Eiweißbestimmung nach Weichselbaum*

1. Biuretreagenz  
Kaliumnatriumtartrat ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 9 g  
Natronlauge (0,2 mol/l) 1000 ml

Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	3 g
Kaliumjodid	5 g
2. alkalische Tartratlösung (für Leerwertsbestimmung)	
Kaliumnatriumtartrat ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	9 g
Natronlauge (0,2 mol/l)	1000 ml

## Arbeitsschema

## Biuret-Methode

	Analyse		Analysenleerwert	
	Weg I	Weg II	Weg I	Weg II
	ohne Na-Desoxycholat	mit Na-Desoxycholat	ohne Na-Desoxycholat	mit Na-Desoxycholat
Leberhomogenat (10 %)	$\mu\text{l}$ 20	$\mu\text{l}$ 20	$\mu\text{l}$ 20	$\mu\text{l}$ 20
Na-Desoxycholat***	—	1000	—	1000

15 Minuten bei 37° C bzw. (45°) \*\* für Weg II

Biuretlösung	1000	1000	—	—
Alkalische Tartratlösung	—	—	1000	1000

Nach 30 Minuten bei 37° Extinktionen bei 546 nm messen gegen Reagenzienleerwert (RL)

Standard\*: Versatol 2,5; 5; 10; 20  $\mu\text{l}$ 

Standardfehler der Methode	1,3 %	1,1 %
----------------------------	-------	-------

\* Jedem Analysenweg entsprechend wird ein Standard verwendet.

\*\* Inkubation bei 45° führt zu besseren Resultaten.

\*\*\* 20 prozentige wäßrige Lösung

## Lowry-Methode

	Analyse		Analysenleerwert	
	Weg I	Weg II	Weg I	Weg II
	ohne Na-Desoxycholat	mit Na-Desoxycholat	ohne Na-Desoxycholat	mit Na-Desoxycholat
Leberhomogenat <sup>x</sup> (1 %)	$\mu\text{l}$ 20	$\mu\text{l}$ 20	$\mu\text{l}$ 20	$\mu\text{l}$ 20
Na-Desoxycholat (20 %)	—	100	—	100

15 Minuten bei 37° C

Alkalische Kupferlösung	1000	1000	—	—
Alkalische Tartratlösung	—	—	1050	1050

10 Minuten stehen lassen

Folin-Reagenz/H <sub>2</sub> O (1:1)	50	50	—	—
--------------------------------------	----	----	---	---

Nach 30 Minuten bei 578 nm (bzw. 660 nm) messen gegen RL

Standard\*: Versatol (1:10 verdünnt) — 2,5; 5; 10  $\mu\text{l}$ 

Standardfehler der Methode	2,1 %	1,7 %
----------------------------	-------	-------

<sup>x</sup> Hergestellt aus 10 prozentigem Homogenat durch verdünnen mit Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 7,4)

## Gewebsaufbereitung:

Jungen Wistar-Ratten (8 Wochen) wurden nach Tötung mit CO<sub>2</sub>-Gas die Lebern sowie Peritonealfett entnommen. Das peritoneale Fettgewebe wurde anschließend in Chloroform homogenisiert (Polytron), die nicht löslichen Anteile abfiltriert und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt. Die Lebern wurden in physiologischer NaCl-Lösung mit der Schere zerkleinert, die Teilstücke über Gaze filtriert, mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Gaze abgetrocknet. Dann wurde ein Homogenat in 0,1 mol/l Phosphatpuffer (pH 7,4) hergestellt (1 g Leber + 9 ml Puffer) und dasselbe 20 Minuten bei 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 9 Portionen aufgeteilt und diese mit steigenden Mengen Peritonealfett versetzt (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 160 mg Fett/g Leber).

## Eiweißbestimmung

Alle Proteinbestimmungen wurden nach dem voran beschriebenen Arbeitsschema durchgeführt, mit und ohne Abzug des Analysenleerwertes. Die in den Tabellen aufgeführten Resultate sind, wenn nicht anders vermerkt, die Mittelwerte der im gleichen Leberhomogenat durchgeführten Bestimmungen. Diese Ergebnisse konnten in Parallelversuchen zusätzlich bestätigt werden.

## Ergebnisse

Zur Rohbilanzierung der Untersuchungen an der Leber wurde zunächst der Wassergehalt bzw. der Trockenrückstand in der Leber bestimmt. Gleichzeitig wurden Homogenate aus Frischlebern hergestellt und nach Zentrifugation die Gewebsanteile im Sediment ermittelt; diejenigen im Überstand wurden rechnerisch erfaßt. Tabelle 1 zeigt die aus zehn Rattenlebern ermittelten Ergebnisse.

Tab. 1. Wassergehalt der Rattenleber und Trockenrückstände des Leberhomogenates im Sediment und Zentrifugationsüberstand:

Untersuchte Parameter	Mittlere Gehaltsangaben aus 10 verschiedenen Bestimmungen
	$\bar{x} \pm s$ (mg/g Leber)
Wassergehalt der Leber (Lyophilisationsverfahren)	725 $\pm$ 14
Trockenrückstand des Sedimentes (nach Zentrifugation)	34 $\pm$ 0,3
Festanteile im Überstand des Zentrifugates (errechnet)	241 $\pm$ 0,3

Diese Bilanzuntersuchung weist nach Abzug des Wassergehaltes in der Rattenleber 275 mg/g Frischgewicht Festbestandteile auf, die homogenisierbar sind. Zieht man davon die zentrifugierbaren Gewebspartikel ab, so verbleiben für den Analysengang im Überstand günstigenfalls etwa 24 % bestimmbarer Gewichtsanteile. Wenn man dann berücksichtigt, daß die Leber auch noch Glykogen, Lipide, anorganische und sonstige organische Bestandteile enthält, wird man in der Annahme bestärkt, daß der in Homogenaten bzw. in Zentrifugaten ermittelte Proteingehalt normaler Rattenlebern unter 200 mg/g Frischgewicht liegt und Analysenwerte, die darüber liegen, Artefakten zuzuschreiben sind. Nach Angaben von Sodeman (9) sind beispielsweise in der menschli-

chen Normalleber etwa 3–6 % des Feuchtgewichtes fettähnliche Substanzen. Bei Leberverfettung können (bezogen auf Totallipide) Lipidanteile bis zu 40 % gefunden werden. *Remmer* (10) beschreibt bei chemisch induzierten Fettlebern (Ratte) auf der Basis von Triglyceridbestimmungen Fettanteile bis zu 5 % des Feuchtgewichtes.

Auf Grund dieser Angaben wurde versucht, durch Zugabe von peritonealem Rattenfett zu den entsprechenden Leberhomogenaten ähnliche Verhältnisse zu simulieren, um zu überprüfen, wie stark die Meßwerte von Eiweißbestimmungen durch die Anwesenheit verschiedener Fettmengen beeinflusst werden.

Zu diesem Zwecke wurden in Rattenleberhomogenaten mit konstantem Protein- und steigendem Fettgehalt Eiweißbestimmungen durch Messung am Eppendorf Photometer nach dem angegebenen Arbeitsschema unter verschiedenen Gesichtspunkten durchgeführt und die Ergebnisse in Tabelle 2 zusammengestellt.

1. Die Proteinbestimmung mit Biuret ergibt ohne Leerwertsabzug und ohne Hilfszusätze mit steigender Fettkonzentration eine Zunahme des methodischen

Fehlers (Trübungseffekt), der im Extremfall (bei 16 % Fettzusatz) bis zu 1000 % betragen kann. Bei der *Lowry*-Methode führen steigende Fettgehalte ebenfalls zu einer Beeinflussung der Resultate (Fehler bis 43 % bei 16 % Fettzusatz). Vergleichend betrachtet, erweist sich unter diesen Meßbedingungen die Biuretmethode für Gewebseiweißbestimmung als nicht sehr geeignet; dagegen liefert die *Lowry*-Methode bis zu einem Fettzusatz von 4 % brauchbare Werte, vorausgesetzt man akzeptiert einen Analysenfehler bis zu 10 %.

2. Versucht man den Trübungseffekt des Fettes durch Leerwertsabzug auszuschalten, ergeben sich bei der *Folin*-Reaktion durchaus brauchbare Werte, obwohl auch hier bei höheren Fettkonzentrationen (8–16 % Fettzusatz) eine leichte Abnahme der Proteinwerte sichtbar wird. Bei der Bestimmung mit Biuretreagenz versagt diese Differenzmessung vollständig. Die schlecht reproduzierbaren Proteinwerte fallen zu niedrig aus, und sie werden zudem mit steigender Fettkonzentration immer kleiner (*Tyndall*-Effekt).

3. Auf Grund obiger Resultate wurde versucht, die Fettrübung mit Detergenzien auszuschalten (Brij- 35,

Tab. 2. Total-Protein Bestimmung an Rattenleberhomogenaten mit konstantem Proteingehalt in Abhängigkeit zur zugesetzten Menge an peritonealem Rattenfett (Mittelwerte aus je drei Analysen des gleichen Homogenates). ( $\bar{x} \pm \Delta X$ : Mittlerer Meßwert  $\pm$  Standardabweichung).

Anteil zu- gesetzten Peritoneal- fettes zum Homoge- nat (in Prozent des Leber- gewichtes)	Bestimmung mit Biuretreagenz ohne Leerwertsabzug				Bestimmung mit <i>Folin-Ciocalteu</i> -Phenol-Reagenz ohne Leerwertsabzug			
	ohne Desoxycholat		mit Desoxycholat-Na (20 %)		ohne Desoxycholat		mit Desoxycholat-Na (20 %)	
	Protein in mg/g Leber $\bar{x} \pm \Delta X$	Abweichung der Protein- werte in %	Protein in mg/g Leber $\bar{x} \pm \Delta X$	Abweichung der Protein- werte in %	Protein in mg/g Leber $\bar{x} \pm \Delta X$	Abweichung der Protein- werte in %	Protein in mg/g Leber $\bar{x} \pm \Delta X$	Abweichung der Protein- werte in %
0	180 $\pm$ 5	–	149 $\pm$ 4	–	141 $\pm$ 4	–	142 $\pm$ 5	–
1	238 $\pm$ 3	+ 32	145 $\pm$ 2	– 3	143 $\pm$ 2	+ 1	141 $\pm$ 8	– 1
2	351 $\pm$ 6	+ 95	150 $\pm$ 2	+ 1	148 $\pm$ 4	+ 5	140 $\pm$ 8	– 2
3	574 $\pm$ 8	+ 219	166 $\pm$ 2	+ 11	153 $\pm$ 2	+ 8	137 $\pm$ 3	– 4
4	594 $\pm$ 11	+ 230	161 $\pm$ 3	+ 8	157 $\pm$ 3	+ 11	142 $\pm$ 7	0
5	762 $\pm$ 7	+ 323	175 $\pm$ 5	+ 17	163 $\pm$ 6	+ 16	135 $\pm$ 2	– 5
6	906 $\pm$ 7	+ 403	179 $\pm$ 1	+ 20	170 $\pm$ 4	+ 21	143 $\pm$ 2	+ 1
8	1202 $\pm$ 9	+ 568	204 $\pm$ 4	+ 37	176 $\pm$ 5	+ 25	139 $\pm$ 6	– 2
16	2058 $\pm$ 36	+ 1042	300 $\pm$ 6	+ 101	202 $\pm$ 10	+ 43	146 $\pm$ 4	+ 3
	mit Leerwertsabzug				mit Leerwertsabzug			
0	96 $\pm$ 9	–	150 $\pm$ 2	–	146 $\pm$ 2	–	141 $\pm$ 0	–
1	86 $\pm$ 0	– 11	150 $\pm$ 1	0	147 $\pm$ 0	+ 1	143 $\pm$ 2	+ 1
2	70 $\pm$ 0	– 28	145 $\pm$ 4	– 3	147 $\pm$ 4	+ 1	147 $\pm$ 4	+ 4
3	61 $\pm$ 0	– 37	145 $\pm$ 3	– 3	142 $\pm$ 2	– 3	144 $\pm$ 2	+ 2
4	70 $\pm$ 3	– 28	130 $\pm$ 2	– 14	147 $\pm$ 4	+ 1	141 $\pm$ 0	0
5	67 $\pm$ 4	– 30	120 $\pm$ 4	– 21	147 $\pm$ 4	+ 1	139 $\pm$ 6	– 1
6	67 $\pm$ 4	– 30	110 $\pm$ 7	– 27	143 $\pm$ 4	– 2	142 $\pm$ 5	+ 1
8	67 $\pm$ 4	– 30	110 $\pm$ 5	– 27	139 $\pm$ 4	– 5	145 $\pm$ 4	+ 3
16	35 $\pm$ 13	– 64	75 $\pm$ 9	– 50	135 $\pm$ 4	– 8	136 $\pm$ 4	– 4

- Levor IV, Sterox SE, Aerosol und Natriumdesoxycholat). Hierbei zeigte sich nur Natriumdesoxycholat bei beiden Methoden zur Unterdrückung der Fetttrübung geeignet. In Anwesenheit von diesem Detergenz liefert die Biuretmethode bei Fettanteilen bis zu 4 % brauchbare Meßresultate. Höhere Fettkonzentrationen ergeben ohne Leerwertsabzug höhere Proteinwerte (max. bis 100 % bei 16 % Fettzusatz). Leerwertsabzug dagegen führt bei Fettkonzentrationen über 5 % zu niederen Resultaten. Bei der *Lowry*-Methode finden sich jedoch nach Zusatz von Desoxycholat (mit und ohne Leerwertsabzug) bei verschiedenen Fettkonzentrationen konstante Proteinwerte.
4. Untersuchungen mit weiteren Hilfsstoffen (z. B. Harnstoff, Propandiol-1,2), die in der Literatur z. T. für Proteinbestimmungen im trüben Serum empfohlen werden (11, 12), führen bei der Bestimmung mit Biuretreagenz in Homogenaten nicht zu den erwünschten Resultaten (siehe Tab. 3). Auch die Entfärbung der Biuret-Reaktion mit KCN und Abzug des dadurch erhaltenen Probenleerwertes ergibt keine brauchbaren Ergebnisse (Überkorrektur). Extraktion des Fettes mit organischen Lösungsmitteln und an-

schließende Bestimmung des Proteins mit Biuret- bzw. *Folin*-Reagenz führt natürlich unter den gegebenen Bedingungen zur Beseitigung des Fett-Trübungseinflusses.

Weiterhin fiel uns bei den oft wiederholten Untersuchungen auf, daß der Trübungsfehler bei der Bestimmung mit Biuretreagenz je nach Aufarbeitungsverfahren und Dispergierung zum Teil beträchtlich variieren kann (Fettschichtung).

5. Zusätzlich wurde der Einfluß verschiedener Fettmengen auf verschiedene Proteinmengen untersucht. Dabei zeigte sich, daß beides, Eiweiß- und Fettgehalt, für die Meßfehlergröße bei der Bestimmung mit Biuretreagenz verantwortlich sind (Tab. 4). Bei einem Fettzusatz bis 8 % ist der Trübungsfehler umso größer, je kleiner der Eiweißgehalt ist; bei höheren Fettanteilen finden wir ohne Berücksichtigung besonderer Versuchsvorkehrungen infolge gesteigerter Fettschichtung eine Verminderung in der Zunahme des Trübungseffektes.
6. Die vorwiegend auf den *Tyndall*-Effekt zurückzuführenden schlechten Ergebnisse bei der Bestimmung mit Biuretreagenz mit Leerwertsabzug veranlaßten

Tab. 3. Total-Protein Bestimmung an Rattenleberhomogenaten\* mit konstantem Proteingehalt in Abhängigkeit zur zugesetzten Menge an peritonealem Rattenfett (Mittelwerte aus je drei Analysen des gleichen Homogenates). Messung in Anwesenheit verschiedener Hilfsstoffe.  
( $\bar{x} \pm \Delta X$ : Mittlerer Meßwert  $\pm$  Standardabweichung).

Anteil zugesetzten Peritonealfettes zum Homogenat (in % des Lebergewichtes)	Bestimmung mit Biuretreagenz (ohne Leerwertsabzug)							
	ohne Zusatz		mit Harnstoff		mit Propandiol-1,2		mit Desoxycholat-Na (20 %)	
	Protein in mg/g Leber $\bar{x} \pm \Delta X$	Abweichung der Proteinwerte in %	Protein in mg/g Leber $\bar{x} \pm \Delta X$	Abweichung der Proteinwerte in %	Protein in mg/g Leber $\bar{x} \pm \Delta X$	Abweichung der Proteinwerte in %	Protein in mg/g Leber $\bar{x} \pm \Delta X$	Abweichung der Proteinwerte in %
0	177 $\pm$ 0	—	200 $\pm$ 18	—	180 $\pm$ 7	—	150 $\pm$ 0	—
4	407 $\pm$ 12	+ 130	500 $\pm$ 22	+ 150	590 $\pm$ 14	+ 228	165 $\pm$ 0	+ 10
8	782 $\pm$ 8	+ 342	860 $\pm$ 51	+ 330	1110 $\pm$ 7	+ 516	195 $\pm$ 6	+ 30
15	1975 $\pm$ 60	+ 1016	880 $\pm$ 52	+ 340	1280 $\pm$ 30	+ 611	355 $\pm$ 10	+ 136
30	2221 $\pm$ 23	+ 1155	1280 $\pm$ 32	+ 540	1710 $\pm$ 45	+ 850	560 $\pm$ 0	+ 273

\* Neu hergestelltes Leberhomogenat.

Tab. 4. Totalproteinbestimmung mit Biuretreagenz in Anwesenheit von verschiedenen Fett- und Eiweißmengen (ohne Leerwertsabzug).

Fettzusatz in % des „Lebergewichtes“	Eiweißgehalt *mg/g „Leber“		Fehler		Fehler	
	mg/g	in %	mg/g	in %	mg/g	in %
0	177 $\pm$ 0	—	127 $\pm$ 0	—	79 $\pm$ 5	—
4	407 $\pm$ 12	+ 130	367 $\pm$ 5	+ 189	403 $\pm$ 14	+ 410
8	782 $\pm$ 8	+ 342	961 $\pm$ 5	+ 656	639 $\pm$ 28	+ 709
15	1975 $\pm$ 60	+ 1016	1170 $\pm$ 21	+ 821	773 $\pm$ 18	+ 879
30	2221 $\pm$ 23	+ 1155	1400 $\pm$ 48	+ 1002	876 $\pm$ 36	+ 1009

\* Hergestellt durch Verdünnen von Leberhomogenat mit Phosphatpuffer. Die Fettmengen wurden dann einzeln zugewogen.

uns, diese sogenannte Differenzmethode (Biuret) am Pye Unicam SP-1800 mit einer speziellen Einrichtung für Trübungsmessungen zu wiederholen. Hierbei zeigte sich, daß bei dieser Meßanordnung die Proteinbestimmung mit Desoxycholat brauchbare Werte liefert. Ohne Detergenz sind die Resultate bis 8 % Fettgehalt annehmbar, sie fallen jedoch durchschnittlich etwas niedriger aus (Tab. 5).

Tab. 5. Totalproteinbestimmung mit Biuretreagenz unter Abzug der Leerwerte, gemessen am Unicam-Photometer SP-1800 in sekundärer Meßposition (Mittelwert aus zwei Bestimmungen des gleichen Homogenates).

Anteil zuge- setzten Peri- tonealfettes zum Homo- genat (in Pro- zent des Le- bergewichtes)	Bestimmung mit Biuretreagenz			
	ohne Desoxycholat		mit Desoxycholat	
	Protein in mg/g Leber	Abweichung der Protein- werte in Prozenten	Protein in mg/g Leber	Abwei- chung der Protein- werte in Prozenten
	$\bar{x} \pm \Delta X$		$\bar{x} \pm \Delta X$	
0	147 $\pm$ 9*	—	162 $\pm$ 8*	—
1	147 $\pm$ 9	0	162 $\pm$ 8	0
2	151 $\pm$ 8	+ 2	162 $\pm$ 8	0
3	148 $\pm$ 0	+ 1	170 $\pm$ 0	+ 5
4	138 $\pm$ 0	— 6	162 $\pm$ 8	0
5	143 $\pm$ 5	— 3	162 $\pm$ 8	0
6	143 $\pm$ 5	— 3	162 $\pm$ 8	0
8	152 $\pm$ 4	+ 3	155 $\pm$ 15	— 4
16	183 $\pm$ 8	+ 24	170 $\pm$ 0	+ 5

\* Neu hergestelltes Leberhomogenat.

$\bar{x} \pm \Delta X$ : Mittlerer Meßwert  $\pm$  Standardabweichung

## Diskussion

Die Proteinbestimmung in Homogenaten ist noch heute ein analytisches Problem. Es besteht im wesentlichen darin, daß Absorptions- bzw. Transmissionsmessungen, die dem Beer-Lambert'schen-Gesetz unterliegen, im trüben Milieu vorgenommen werden müssen und dadurch vom sogenannten Tyndall-Effekt (Streulichteffect) überlagert werden. Aus diesem Grunde können z. T. bei der photometrischen Messung von Gewebsproteinen (ohne Leerwertsabzug und ohne Hilfszusätze) höhere Resultate, bei Differenzmessungen mit Spektrophotographen ohne spezielle Einrichtung zur Ausschaltung bzw.

Unterdrückung der Streustrahlung niedere Werte resultieren. Wir haben in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Fettrübung diese Problematik behandelt; hierbei ergaben sich zwei Möglichkeiten zur direkten Unterdrückung der Fehlerquellen:

1. Beseitigung der Trübungsursache durch Detergenz-zusatz (Desoxycholat).
2. Verwendung von Spektralphotometern mit Meßeinrichtungen, die geeignet sind, die Streustrahlung zu unterdrücken (evtl. Einbau von küvettennahen „Streustrahl-Sammellinsen“ in gewöhnliche Routinegeräte).

Beim Vergleich der beiden photometrischen Methoden zeigt die Reaktion nach *Folin-Ciocalteu* bei der Gewebsproteinbestimmung unter herkömmlichen Bedingungen gegenüber der reinen Biuretreaktion einen gewissen Vorteil. Dieser ist darauf zurückzuführen, daß der auf dem *Folin*-Reagenz basierende zusätzliche Reduktionsschritt (Reduktion von Heteropolysäuren zu blauem Farbstoff) die Methode etwa 10 mal empfindlicher macht. Dadurch wird natürlich für die Proteinbestimmung die notwendige Menge an Homogenat und der Einfluß des Trübungseffektes entsprechend vermindert. Allerdings müssen wir bei Verwendung von *Folin*-Reagenz eine geringere Spezifität durch die bekannten Interferenzen mit Substanzen wie z. B. Kohlenhydrate, Purine und gewisse Arzneimittel in Kauf nehmen (13–15).

Die viel spezifischere Biuretreaktion sollte bei der Gewebsproteinbestimmung nur bei Vorhandensein geeigneter Spektrophotometer mit spezieller Anordnung für Trübungsmessungen und unter Abzug des Analysenleerwertes vorgenommen werden. Andernfalls ist die *Lowry*-Methode vorzuziehen, wie die voran beschriebenen Resultate zeigen.

Der Gewebsproteingehalt wird heute vielfach als Bezugsgröße für andere Gewebsparameter verwendet, und Unklarheiten in der Proteinbestimmung können daher sehr leicht auf Grund der beschriebenen Artefakte zu falschen Schlußfolgerungen verleiten. Wir hoffen, mit der vorliegenden Arbeit zur Klärung dieses analytischen Problems beitragen zu können.

## Danksagung

Für die Mithilfe bei der Durchführung der Bestimmungen möchten wir Fr. A. Schütze und Fr. D. Ulrich herzlich danken.

## Literatur

1. Weichselbaum, T. E. (1946), Amer. J. Clin. Pathol. 7, 40.
2. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randa (1951), J. Biol. Chem. 193, 265–275.
3. Murphy, S. D., & Malley, S. (1969), Toxicol Appl. Pharmacol. 15, 117–130.
4. Dewhurst, F., & Kitchen, D. A. (1973), Biochem. Pharmacol., 22, 561–566.
5. Jori, A., Pescador, R., & Pugliatti, C. (1971), Biochem. Pharmacol., 20, 2695–2701.
6. Argyris, T. S., & Magnus, D. R. (1968), Develop. Biol. 17, 187–201.
7. Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J. W., Fowler, S., & De Duve, Ch. (1968), J. Cell. Biol., 37, 482–513.

9. Sudeman, W. A. & Sodeman, Jr. (1967), *Pathologic Physiology*, Fourth Edition, 665-666, Verlag Saunders, Philadelphia.
10. Remmer, H. (1968), *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Pathol.* 260, 90.
11. Richtsch, R., (1970), *Klinische Chemie, Theorie und Praxis*, 3. erweiterte Auflage, S. 305-309, Verlag S. Karger, Basel.
12. Futtermann, S., & Rollins, M. H. (1973), *Anal. Biochem.* 51, 443-447.
13. Bonitati, J., Elliot, W. B., & Miles P. G. (1969), *Anal. Biochem.* 31, 399-404.
14. Bocter, F. N. (1972), *Anal. Biochem.* 50, 500-502.
15. Pashley, D. H., Schuster, G. S., Palmer, P., & Sharawy (1973), *Clin. Chem.* 19, 263-265.

Dr. rer. nat. Alfons Metz,  
Sandoz AG,  
CH-4002 Basel (Schweiz)